



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 296 395**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99932626 .7**

86 Fecha de presentación : **05.05.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1078004**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2001**

54 Título: **Construcciones de anticuerpos tetravalentes.**

30 Prioridad: **05.05.1998 DE 198 19 846**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

73 Titular/es: **Deutsches Krebsforschungszentrum
Stiftung des öffentlichen Rechts
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es: **Little, Melvyn y
Kipriyanov, Sergej**

74 Agente: **García-Cabrerizo y del Santo, Pedro María**

ES 2 296 395 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Construcciones de anticuerpos tetravalentes.

5 La presente invención se refiere a construcciones de anticuerpos F_v multivalentes, a plásmidos de expresión que las codifican y a un método para producir las construcciones de anticuerpos F_v así como al uso de las mismas.

10 Los anticuerpos naturales son dímeros y por lo tanto se denominan bivalentes. Tienen cuatro dominios variables, de hecho, dos dominios V_H y dos dominios V_L . Los dominios variables sirven como sitios de unión para un antígeno, configurándose un sitio de unión a partir de un dominio V_H y un dominio V_L . Los anticuerpos naturales reconocen cada uno un antígeno, de modo que también se denominan monoespecíficos. Además, también tienen dominios constantes. Los mismos contribuyen a la estabilidad de los anticuerpos naturales. Por otro lado también son co-responsables de reacciones inmunes no deseadas, que se producen cuando se administran mutuamente anticuerpos naturales de diferentes especies animales.

15 Para evitar dichas respuestas inmunes se construyen anticuerpos que carecen de los dominios constantes. En particular, estos son anticuerpos que ya solamente comprenden los dominios variables. Dichos anticuerpos se denominan construcciones de anticuerpos F_v . A menudo están disponibles en forma de monómeros de cadena sencilla emparejados entre sí.

20 Sin embargo, se ha demostrado que las construcciones de anticuerpos F_v presentan solamente una baja estabilidad. Por lo tanto, su capacidad de uso con propósitos terapéuticos está muy limitada.

25 En el estado de la técnica se conocen moléculas de anticuerpos F_v de cadena única biespecíficos con cuatro dominios variables que están unidos entre sí por enlazadores peptídicos (Journal of Immunology, 152(11), (1994), 5368-74; Proceedings of the National Academy of the United States of America, 92(15), (1995), 7021-5; Journal of Immunology, 154(9), (1995), 4576-82 y Molecular Immunology, 32(17-18), (1995), 1405-12).

30 En el documento EP 0952218 se describe una construcción de anticuerpos multivalentes en la forma de $V_H-L-V_L P-V_H-L-V_L$, donde con V se indican dominios variables y con L y P enlazadores peptídicos. Los enlazadores L tienen una longitud de 1-20 aminoácidos y el enlazador P tiene una longitud de 12-20 aminoácidos. Por el enlazador P de 12-20 aminoácidos de longitud, la construcción se pliega intramolecularmente.

35 Por lo tanto, la presente invención tiene el objetivo de proporcionar un anticuerpo con el que se puedan evitar las reacciones inmunes no deseadas. Además debe tener una estabilidad que lo haga útil con propósitos terapéuticos. De acuerdo con la invención, esto se consigue mediante los objetos de las reivindicaciones.

40 Por lo tanto, es objeto de la presente invención una construcción de dímero de anticuerpos F_v tetravalente que presente una gran estabilidad. Dicha construcción es adecuada con propósitos diagnósticos y terapéuticos.

45 La presente invención se basa en las observaciones del solicitante de que la estabilidad de una construcción de anticuerpos F_v puede aumentar si está presente en forma de un dímero de cadena sencilla en el que los cuatro dominios variables están unidos entre sí mediante tres enlazadores peptídicos. El solicitante también observó que la construcción de anticuerpo F_v se pliega consigo misma cuando el enlazador peptídico central tiene una longitud de aproximadamente 10-30 aminoácidos. El solicitante también observó que la construcción de anticuerpo F_v se pliega con otras construcciones de anticuerpo F_v cuando el enlazador peptídico central tiene una longitud de aproximadamente hasta 10 aminoácidos, por lo que se obtiene una construcción de anticuerpo F_v multimérica, es decir, multivalente. El solicitante también observó que la construcción de anticuerpo F_v puede ser multiespecífica.

50 De acuerdo con la invención, las observaciones del solicitante se utilizan para proporcionar una construcción de anticuerpo F_v multivalente que comprende cuatro dominios variables que se unen entre sí mediante los enlazadores peptídicos 1, 2 y 3.

55 La expresión "construcción de anticuerpo F_v " se refiere a un anticuerpo que tiene dominios variables pero no dominios constantes.

60 La expresión "construcción de anticuerpo F_v multivalente" se refiere a un anticuerpo F_v que tiene varios, sin embargo al menos cuatro dominios variables. Esto se consigue cuando la construcción de anticuerpo F_v de cadena sencilla se pliega con otras construcciones de anticuerpos F_v de cadena sencilla. En este caso, se proporciona una construcción de anticuerpo F_v que tiene 8 dominios variables. Es favorable que la construcción de anticuerpo F_v tenga cuatro dominios variables, es decir, que sea tetravalente (compárese Fig. 1). Además, los dominios variables pueden ser iguales o diferentes entre sí, de modo que la construcción de anticuerpo reconoce uno o varios antígenos. La construcción de anticuerpo reconoce preferiblemente uno o dos antígenos, es decir, es monoespecífica o biespecífica. Son ejemplos de dichos antígenos las proteínas CD19 y CD3.

65 La expresión "enlazadores peptídicos 1, 3" se refiere a un enlazador peptídico que es adecuado para unir entre sí dominios variables de una construcción de anticuerpo F_v . El enlazador peptídico puede contener cualquier aminoácido, prefiriéndose los aminoácidos glicina (G), serina (S) y prolina (P). Los enlazadores peptídicos 1 y 3 pueden ser iguales

o diferentes entre sí. Además, el enlazador peptídico puede tener una longitud de aproximadamente 0-10 aminoácidos. En el primer caso, el enlazador peptídico es solamente un enlace peptídico entre el resto COOH de uno de los dominios variables y el resto NH₂ de otro de los dominios variables. El enlazador peptídico comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos GG.

5

La expresión “enlazador peptídico 2” se refiere a un enlazador peptídico que es adecuado para unir entre sí dominios variables de una construcción de anticuerpo F_v. El enlazador peptídico puede contener cualquier aminoácido, prefiriéndose los aminoácidos glicina (G), serina (S) y prolina (P). El enlazador peptídico también puede tener una longitud de aproximadamente 3-10 aminoácidos, particularmente de 5 aminoácidos y más particularmente la secuencia de aminoácidos GGPGS, por lo que se consigue que la construcción de anticuerpo F_v de cadena sencilla se pliegue consigo misma.

10

Un dímero de anticuerpo F_v tetravalente de acuerdo con la invención puede producirse mediante métodos convencionales. Un método favorable es aquel en el que los ADN que codifican los enlazadores peptídicos 1, 2 y 3 se ligan con los ADN que codifican los cuatro dominios variables de una construcción de anticuerpo F_v de modo que los enlazadores peptídicos unan los dominios variables entre sí, y la molécula de ADN resultante se exprese en un plásmido de expresión. Se hace referencia a los Ejemplos 1-6. Con respecto a - las expresiones “construcción de anticuerpo F_v” y “enlazador peptídico” se hace referencia a las explicaciones anteriores. De forma complementaria se hace referencia a Maniatis, T. *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

20

Los ADN que codifican una construcción de anticuerpo F_v de acuerdo con la invención también son objeto de la presente invención. Además, los plásmidos de expresión que contienen dichos ADN también son objeto de la presente invención. Los plásmidos de expresión preferidos son pDISC3x19-SL, pPIC-DISC-SL y pDISC6-SL. Los dos primeros se depositaron en la DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellen) [Colección Alemana de Microorganismos y Células] el 30 de abril de 1998 como DSM 12149 o DSM 12151.

25

Otro objeto de la presente invención es un kit que comprende:

30

- (a) un dímero de anticuerpo F_v tetravalente de acuerdo con la invención y/o,
- (b) un plásmido de expresión de acuerdo con la invención y
- (c) agentes auxiliares convencionales tales como tampones, disolventes y controles.

35

Pueden estar presentes uno o varios representantes de los componentes individuales.

40

La presente invención proporciona un dímero de anticuerpo F_v tetravalente multivalente en el que los dominios variables se enlazan entre sí mediante enlazadores peptídicos. Dicha construcción de anticuerpo se caracteriza porque no contiene partes que puedan conducir a reacciones inmunes no deseadas. Además, tiene una gran estabilidad. También permite unirse a varios antígenos simultáneamente. Por lo tanto, la construcción de anticuerpo F_v de acuerdo con la invención se adapta perfectamente al uso no solamente para fines diagnósticos, sino también terapéuticos. Dichos fines pueden contemplarse con respecto a cualquier enfermedad, particularmente una enfermedad vírica, bacteriana o tumoral.

45

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra la organización genética de una construcción de anticuerpo F_v (A) de acuerdo con la invención y esquemas para formar una construcción de anticuerpo F_v tetravalente (B). Ag: antígeno, His₆: seis restos de histidina C-terminales; stop: codón de terminación (TAA), V_H y V_L: región variable de las cadenas pesada y ligera.

50

La Fig. 2 muestra el esquema para la construcción del plásmido pDISC3x19-SL. *c-myc*: secuencia que codifica un epítipo que es reconocido por el anticuerpo 9E1, His₆: secuencia que codifica seis restos de histidina C-terminales; PeIB: secuencia del péptido señal de la peptidasa bacteriana (PeIB líder); rbs: sitio de unión al ribosoma; stop: codón de terminación (TAA); V_H y V_L: región variable de las cadenas pesada y ligera.

55

La Fig. 3 muestra un diagrama del plásmido de expresión pDISC3x19-SL. 6xHis: secuencia que codifica seis restos de histidina C-terminales. bla: gen que codifica β-lactamasa que es responsable de la resistencia a ampicilina; pb: pares de bases; *c-myc*: secuencia que codifica un epítipo que es reconocido por el anticuerpo 9E10; CoIE1: origen de replicación del ADN; f1-IG: región intergénica del bacteriófago f1; Lac P/O: promotor/operador del operón *lac* wt; enlazador 1: secuencia que codifica un dipéptido Gly-Gly que enlaza los dominios V_H y V_L; enlazador 3; secuencia que codifica un oligopéptido GlyGlyProGlySer, que enlaza los fragmentos scFv híbridos; líder PeI-B: secuencia del péptido señal de la peptidasa bacteriana; rbs: sitio de unión al ribosoma; V_H y V_L: región variable de las cadenas pesada y ligera.

60

La Fig. 4 muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos obtenida para la construcción de anticuerpos F_v tetravalente codificada por el plásmido de expresión pDISC3x19-SL. epítipo *c-myc*: secuencia que codifica un epítipo que es reconocido por el anticuerpo 9E10; CDR: región determinante de complementariedad; marco: región marco; cola His₆: secuencia que codifica seis restos de histidina C-terminales; líder PeIB: secuencia del

65

ES 2 296 395 T3

péptido señal de la pectato liasa bacteriana; RBS: sitio de unión al ribosoma; V_H y V_L: región variable de las cadenas pesada y ligera.

La Fig. 5 muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos obtenida de una conexión entre un gen que codifica una secuencia líder de factor α y un gen que codifica la construcción de anticuerpo F_v tetravalente en el plásmido de expresión *pPIC-DISC-SL*. Señal del factor alfa: secuencia del péptido líder de la señal de secreción del factor α de *Saccharomyces cerevisiae*; V_H: región variable de la cadena pesada. Los rombos indican los sitios de escisión de la señal.

La Fig. 6 muestra un diagrama del plásmido de expresión *pDISC6-SL*. 6xHis: secuencia que codifica seis restos de histidina C-terminales. bla: gen que codifica β -lactamasa, que es responsable de la resistencia a ampicilina; pb: pares de bases; *c-myc*: secuencia que codifica un epítipo que es reconocido por el anticuerpo 9E10; hok-sok: locus del ADN que estabiliza el plásmido; LacI: gen que codifica el represor Lac; Lac P/O: promotor/operador del operón lac wt; LacZ': gen que codifica el péptido $\alpha\alpha$ de β -galactosidasa; enlazador 1: secuencia que codifica un dipéptido GlyGly que enlaza los dominios V_H y V_L; enlazador 3: secuencia que codifica un oligopéptido GlyGlyProGlySer que enlaza los fragmentos scFv híbridos; M13 IG: región intergénica del bacteriófago M13; pBR322ori: origen de replicación del ADN; líder Pel-B: secuencia del péptido señal de la pectato liasa bacteriana; rbs: sitio de unión al ribosoma que se origina a partir del gen LacZ de *E. coli* (*lacZ*), a partir del gen 10 del bacteriófago T7 (T7g10) o a partir del gen *skp* de *E. coli* (*skp*); *skp*: gen que codifica el factor periplásmico bacteriano Skp/OmpH; tHP: terminador fuerte de la transcripción; tIPP: terminador de la transcripción; V_H y V_L: región variable de las cadenas pesada y ligera.

Los siguientes ejemplos explican la invención con más detalle.

Ejemplo 1

Construcción del plásmido pDISC3x19-SL para la expresión de construcciones de anticuerpo F_v bivalentes, biespecíficas o tetravalentes, biespecíficas en Bacterias

Los plásmidos *pHOG- α CD19* y *pHOG-dmOKT3* que codifican los fragmentos scFv obtenidos del híbrido HD37 que es específico para CD19 humana (Kipriyanov *et al.*, 1996, *J. Immunol. Meth.* 196: 51-62) o del híbrido OKT3 que es específico para CD3 humana (Kipriyanov *et al.*, 1997, *Protein Eng.* 10: 445-453), se usaron para la construcción de plásmidos de expresión para una construcción de anticuerpo F_v de cadena sencilla. Se produjo un fragmento 1 de PCR de los dominios V_H de anti-CD19, seguido de un segmento que codifica un enlazador Gly-Gly usando los cebadores DP1, 5'-TCACACAGAATTCTTAGATCTATTAAGAGGAGAAATTAACC y DP2, 5'-AGCACACGATATCACCGCCAAGCTTGGGTGTTGTTTTGGC (compárese Fig. 2). El fragmento 1 de PCR se escindió mediante EcoRI y EcoRV y se ligó con el plásmido linealizado con EcoRI/EcoRV *pHOG-dmOKT3*, por lo que se produjo el vector *pHOG19-3*. El fragmento 2 de PCR de los dominios V_L de anti-CD19, seguido de un segmento que codifica un epítipo *c-myc* y una cola de hexahistidinilo, se produjeron usando los cebadores DP3, 5'-AGCACACAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTCACCAAACCTCCA y DP4, 5'-AGCACACTCTAGAGACACAGATCTTTAGTGATGGTGATGGTGATGTGAGTTTAGG. El fragmento 2 de PCR se escindió mediante HindIII y XbaI y se ligó con el plásmido linealizado con HindIII/XbaI *pHOG-dmOKT3*, por lo que se obtuvo el vector *pHOG3-19* (Fig. 2). El gen que codifica el scFv-3-19 híbrido en el plásmido *pHOG3-19* se amplificó mediante PCR con los cebadores Bi3sk, 5'-CAGCCGGCCATGGCGCAGGTGCAACTGCAGCAG y Li-2, 5'-TATATACTGCAGCTGCACCTGCGACCTGGGCCACCAGCGGCCGCAGCATCAGCC CG para la producción de un enlazador GGPGS rígido corto (fragmento 4 de PCR, compárese Fig. 2). El plásmido de expresión y *pDISC3x19-SL* se construyó ligando el fragmento de restricción NcoI/PvuII de *pHOG19-3* que comprende el marco del vector y el fragmentos 4 de PCR escindiendo con NcoI/PvuII (compárese Figs. 3, 4). Las secuencias completas de nucleótidos y de proteínas de las construcciones de anticuerpo F_v tetravalentes se indican en la Fig. 4.

Ejemplo 2

Construcción del Plásmido pPIC-DISC-SL para la expresión de construcciones de anticuerpo F_v tetravalentes, biespecíficas en levadura

(A) Construcción de *pPIC-DISC-SL*

El vector *pPIC α A* (Invitrogen BV, Leek, Países Bajos) para la expresión y secreción de proteínas recombinantes en la levadura *Pichia pastoris* se usó como material de partida. Contiene un gen que codifica la señal de secreción de factor α de *Saccharomyces cerevisiae*, seguida de un polienlazador. La secreción de este vector se basa en el marcador seleccionable dominante, ZeocinTM que es bifuncional en *Pichia* y en *E. coli*. El gen que codifica la construcción de anticuerpo F_v tetravalente (*scDia-SL*) se amplificó por medio de PCR mediante la plantilla *pDIC3x19-SL* usando los cebadores 5-PIC, 5'-CCGTGAATTCCAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGC, y pSEXBn 5'-GGTTCGACGTTAACCGACAAACAACAGATAAAACG. El producto de PCR resultante se escindió mediante EcoRI y XbaI y se ligó en *pPIC α A* linealizado con EcoRI/XbaI. Se obtuvo el plásmido de expresión *pPIC-DISC-SL*. Las secuencias de nucleótidos y de proteína de la construcción de anticuerpo F_v tetravalente se muestran en la Fig. 5.

ES 2 296 395 T3

Ejemplo 3

Expresión de la construcción de anticuerpo F_v tetravalente en bacterias

5 Células de *E. coli*-XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, California) que se habían transformado con el plásmido de expresión pDISC3x19-SL, se cultivaron durante una noche en medio 2xYT con 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y glucosa 100 mM (2xYT_{GA}) a 37°C. Diluciones 1:50 de los cultivos de una noche en 2xYT_{GA} se cultivaron como cultivos de matraz a 37°C con agitación a 200 rpm. Cuando los cultivos alcanzaron un valor de DO₆₀₀ de 0,8, las bacterias se sedimentaron mediante un centrifugado de 10 minutos con 1500 g a 20°C y se cultivaron durante una noche en medio 2xYT con 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y glucosa 100 mM (2xYT_{GA}) a 37°C. Diluciones 1:50 de los cultivos de una noche en 2xYT_{GA} se cultivaron como cultivos de matraz a 37°C con agitación a 200 rpm. Cuando los cultivos alcanzaron un valor de DO₆₀₀ de 0,8, las bacterias se sedimentaron mediante un centrifugado de 10 minutos con 1500 g a 20°C y se resuspendieron en el mismo volumen de medio 2xYT recién preparado que contenía 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y sacarosa 0,4 M. Se añadió IPTG hasta una concentración final de 0,1 mM y el cultivo continuó a temperatura ambiente (20-22°C) durante 15 18-20 horas. Las células se recogieron mediante centrifugado durante 10 minutos a 5000 g a 4°C. El sobrenadante del cultivo se retuvo y se almacenó en hielo. Para aislar las proteínas periplásmicas solubles, las bacterias sedimentadas se resuspendieron en un 5% del volumen inicial de Tris-HCl 50 mM enfriado en hielo, sacarosa al 20%, EDTA 1 mM, pH 8,0. Después de 1 hora de incubación en hielo con agitación ocasional, los esferoplastos se centrifugaron con 30000 g a 4°C durante 30 minutos, obteniéndose el extracto periplásmico soluble como sobrenadante y los esferoplastos con el material periplásmico insoluble como sedimento. El sobrenadante del cultivo y el extracto periplásmico soluble se combinaron y se aclararon mediante centrifugado adicional (30.000 g, 4°C, 40 minutos). El producto recombinante se concentró mediante precipitación con sulfato de amonio (concentración final 70% de saturación). El precipitado de proteínas se obtuvo mediante centrifugado (10.000 g, 4°C, 40 minutos) y se disolvió en el 10% del volumen inicial de Tris-HCl 50 mM, NaCl 1 M, pH 7,0. Se realizó una cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) a 25 4°C usando una columna de 5 ml de sepharose quelante (Pharmacia) que se cargó con Cu²⁺ y se había equilibrado con Tris-HCl 50 mM, NaCl 1M, pH 7,0 (tampón de partida). La muestra se introdujo haciéndola pasar sobre la columna. Después se lavó con veinte volúmenes de columna de tampón de partida, seguido de tampón de partida con imidazol 50 mM hasta que la absorción a 280 nm del eluyente estaba al mínimo (aproximadamente treinta volúmenes de columna). El material absorbido se eluyó con Tris-HCl 50 mM, NaCl 1M, imidazol 250 mM, pH 7,0.

30

Las concentraciones de proteínas se determinaron con el ensayo de unión a colorante de Bradford (1976).

Ejemplo 4

*Expresión de la construcción de anticuerpo tetravalente en la levadura *Pichia Pastoris**

Células GS155 de *P. pastoris* competentes (Invitrogen) se sometieron a electroporación en presencia de 10 μg de ADN de plásmido pPIC-DISC-SL, que se habían linealizado con SacI. Los transformantes se seleccionaron durante 3 días a 30°C en placas YPD que contenían 100 μg de ZeocinTM. Los clones, que secretaban construcciones de anticuerpo 40 F_v bivalentes y/o tetravalentes, se seleccionaron mediante selección de placas usando un anticuerpo monoclonal 9E10 anti-*c-myc* (IC chemikalien, Ismaning, Alemania).

Para la expresión de las construcciones de anticuerpo F_v tetravalentes, los clones se cultivaron en medio YPD en matraces de agitación durante 2 días a 30°C con agitación. Las células se centrifugaron, se resuspendieron en el mismo volumen del medio que contenía metanol y se incubaron durante otros 3 días a 30°C con agitación. Los sobrenadantes se obtuvieron después del centrifugado. El producto recombinante se aisló mediante precipitación con sulfato de amonio, seguido de IMAC, como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 5

50

Caracterización de la construcción de anticuerpo F_v tetravalente

(A) Cromatografía de exclusión por tamaño

55 Se realizó una filtración en gel analítica de las construcciones de anticuerpo F_v en PBS usando una columna superdex-200-HR10/30 (Pharmacia). El volumen de la muestra y el caudal eran de 200 $\mu\text{l/min}$ o 0,5 ml/min. La columna se calibró con kits de calibrado de filtración en gel de alto y bajo peso molecular (Pharmacia).

(B) Citometría de flujo

60

El volumen de la muestra y el caudal eran de 200 $\mu\text{l/min}$ o 0,5 ml/min. La columna se calibró con kits de calibrado de filtración en gel de alto y bajo peso molecular (Pharmacia).

(B) Citometría de flujo

65

La línea Jurkat de leucemia aguda de células T CD3⁺/CD19⁻ y la línea de células B JOK-1 CD19⁺/CD3⁻ se usaron para la citometría de flujo. Se incubaron 5 x 10⁵ células en 50 μl de medio RPMI 1640 (GIBCO BRL, Eggestein, Alemania) que se suplementó con FCS al 10% y azida sódica al 0,1% (denominado medio completo) con 100 μl

ES 2 296 395 T3

de las preparaciones de anticuerpo F_v durante 45 minutos en hielo. Después de lavar usando el medio completo, las células se incubaron con $100 \mu\text{l}$ de $10 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpo monoclonal 9E10 anti-*c-myc* (IC Chemikalien) en el mismo tampón durante 45 minutos en hielo. Después de un segundo ciclo de lavado, las células se incubaron con $100 \mu\text{l}$ de la IgG de cabra anti-ratón marcada con FITC (GIBCO BRL) en las mismas condiciones que anteriormente.

5 Las células se lavaron después de nuevo y se resuspendieron en $100 \mu\text{l}$ de solución de yoduro de propidio de $1 \mu\text{g/ml}$ (Sigma, Déisenhofen, Alemania) en medio completo con la exclusión de células muertas. La fluorescencia relativa de las células teñidas se midió usando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, California).

(C) Ensayo de citotoxicidad

10 La línea celular de linfoma de Burkitt Raji y Namalwa que expresa CD19 se usó como células diana. Las células se incubaron en RPMI 1640 (GIBCO BRL) que se suplementó con FCS inactivado por calor al 10% (GIBCO BRL), glutamina 2 mM y piruvato 1 mM a 37°C en atmósfera húmeda con CO_2 al 7,5%. Los ensayos de células T citotóxicos se realizaron en medio RPMI 1640 suplementado con FCS al 10%, HEPES 10 mM, glutamina 2 mM, piruvato 1

15 mM y 2-ME 0,05 mM. La actividad citotóxica se evaluó usando un ensayo de liberación de ^{51}Cr convencional; se marcaron 2×10^6 células diana con $200 \mu\text{Ci}$. Todo el ensayo se preparó tres veces y se incubó a 37°C durante 4 horas. Se recogieron $100 \mu\text{l}$ del sobrenadante y se ensayó la liberación de ^{51}Cr en un contador gamma (Cobra Auto Gamma; Canberra Packard, Dreieich, Alemania). La liberación máxima se determinó mediante incubación de las células diana en SDS al 10% y la liberación espontánea se determinó mediante la incubación de las células en medio en solitario. La

20 lisis específica (%) se calculó como: (liberación experimental - liberación espontánea)/(liberación máxima - liberación espontánea) x 100.

Ejemplo 6

25 *Construcción del plásmidos pDISC6-SL para la expresión de construcciones de anticuerpo F_v tetravalentes, biespecíficos en bacterias mediante fermentación de alta densidad celular*

Se prepararon vectores de expresión que contenían el sistema suicida de células sin plásmido hok/sok y un gen que codifica el factor periplásmico *skp/OmpH* para una mayor producción de anticuerpos recombinantes. El gen *skp*

30 se amplificó mediante PCR usando los cebadores *skp-1*, 5'-CGA ATT CTT AAG ATA AGA AGG AGT TTA TTG TGA AAA AGT GGT TAT TAG CTG CAG G y *skp-2*, 5'-CGA ATT AAG CTT CAT TAT TTA ACC TGT TTC AGT ACG TCG G usando el plásmido pGAH317 (Holck y Kleppe, 1988, Gene 67: 117-124). El fragmento de PCR resultante se escindió mediante *AfIII* y *HinIII* y se insertó en el plásmido pHKK linealizado con *AfIII/HinIII* (Horn *et al.*, 1996, Appl. Microbio. Biotechnol. 46, 524-532), por lo que se obtuvo el vector pSKK. Los genes obtenidos en el

35 plásmido pDISC3x19-SL y que codifican las construcciones de anticuerpo scFv se amplificaron por PCR mediante los cebadores *fe-1*, 5'-CGA ATT TCT AGA TAA GAA GGA GAA ATT AAC CAT GAA ATA CC y *fe-2*, 5'-CGA ATT CTT AAG CTA TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG TGA G. Los fragmentos de PCR escindidos con *XbaI/AfIII* se insertaron en pSKK antes del inserto *skp*, por lo que se obtuvo el plásmido de expresión pDISC6-SL respectivamente, que contiene un operón tri-cistrónico bajo el control del sistema promotor/operador *lac* (compárese Fig. 6).

ES 2 296 395 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un dímero de anticuerpo F, tetravalente, en el que una construcción de anticuerpo F_v de cadena sencilla está plegado junto con otra construcción de anticuerpo F_v de cadena sencilla del mismo tipo y las dos construcciones de anticuerpo F_v de cadena sencilla comprenden respectivamente cuatro dominios variables, que están unidos entre sí por un enlazador peptídico 1, un enlazador peptídico central 2 y un enlazador peptídico 3, donde los enlazadores peptídicos 1 y 3 comprenden 0-10 aminoácidos.
- 10 2. El dímero de anticuerpo F_v de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el enlazador peptídico central 2 comprende 3-10 aminoácidos.
3. El dímero de anticuerpo F_v de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que el dímero de anticuerpo F_v es biespecífico.
- 15 4. El dímero de anticuerpo F_v de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el dímero de anticuerpo F_v es específico para CD3 y CD19.
5. El dímero de anticuerpo F_v de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que el dímero de anticuerpo F_v es monoespecífico.
- 20 6. Un método para la producción del dímero de anticuerpo F_v tetravalente de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-5, en el que los ADN que codifican los enlazadores peptídicos 1, 2 y 3 se ligan de tal modo con los ADN que codifican los cuatro dominios variables de una construcción de anticuerpo F_v de cadena sencilla, que los enlazadores peptídicos unen entre sí los dominios variables, y la molécula de ADN resultante se expresa en un plásmido de expresión.
- 25 7. Un plásmido de expresión que codifica la construcción de anticuerpo F_v de cadena sencilla de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-5.
- 30 8. El plásmido de expresión de acuerdo con la reivindicación 7, de hecho, pDISC3x19-SL, depositado con el número DSM 12149.
9. El plásmido de expresión de acuerdo con la reivindicación 7, de hecho, pPIC-DISC-SL, depositado con el número DSM 12151.
- 35 10. El plásmido de expresión de acuerdo con la reivindicación 7, de hecho, pDISC6-SL, como se define en la figura 6.
- 40 11. Un uso del dímero de anticuerpo F_v tetravalente de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-5 para la preparación de una composición diagnóstica o terapéutica para el diagnóstico y/o la terapia de enfermedades.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que las enfermedades son enfermedades víricas, bacterianas o tumorales.

45

50

55

60

65

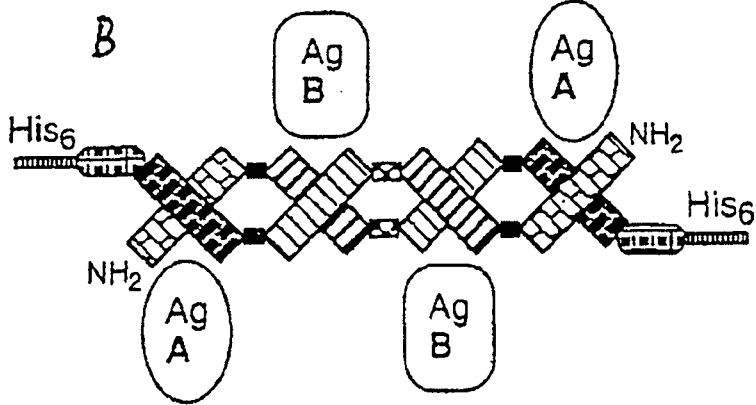
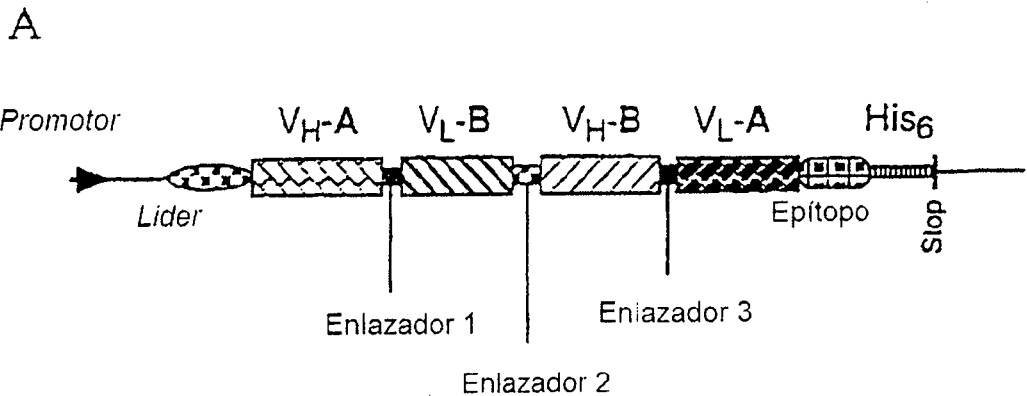


FIGURA 1

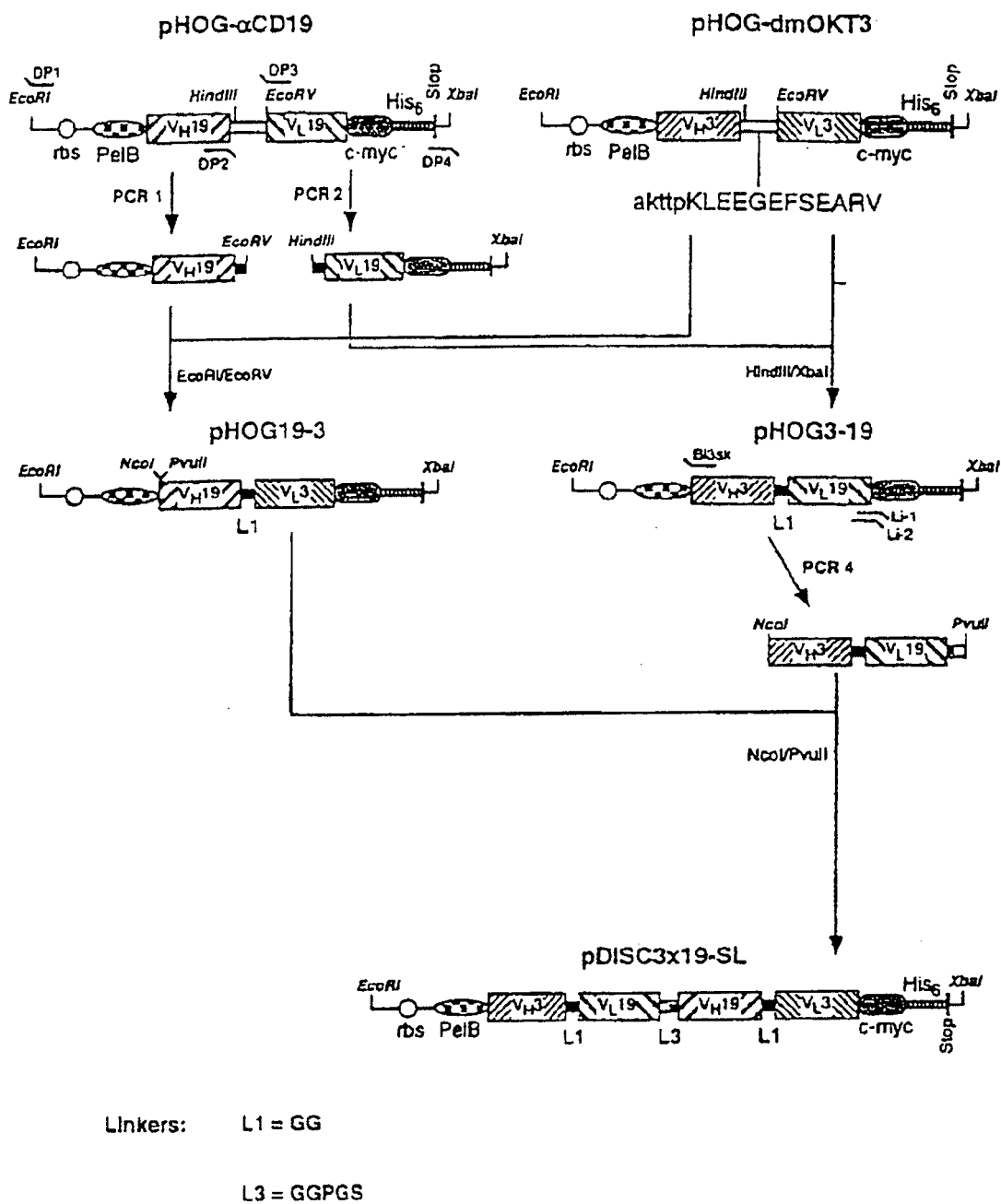


FIGURA 2

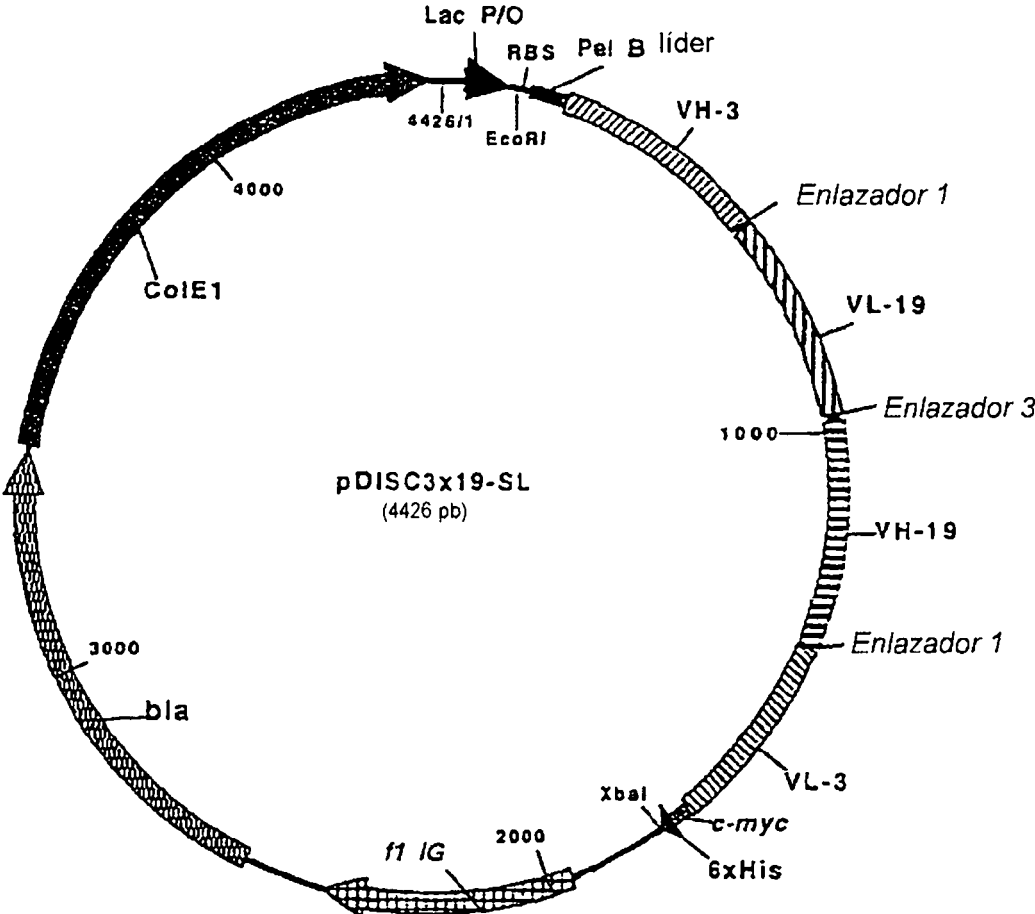


Fig. 3

ES 2 296 395 T3

941 ATGAGATTTCCTTCAATTTTACTGCTGMMTEATTGGCAGCATCCTCCGCATTEAGCTGCTCCAGTCAACACTAC
1 M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T
señal anti-factor alfa

1015 AACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGATG
25 T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D

1089 TTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCT
50 V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A

XhoI EcoRI

1163 GCTAAAGAAGTAGGGGTATCTCTCCGAAACAGAGGCTGAAGCTGAATTCAGGTGCAACTGCAGCAGTC
75 A K E E G V S L E K R E A E A E F Q V Q L Q Q S

VH anti-CD3

1234 TGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT
98 G A E L A R P G A S V K M S C K A S

Fig.5

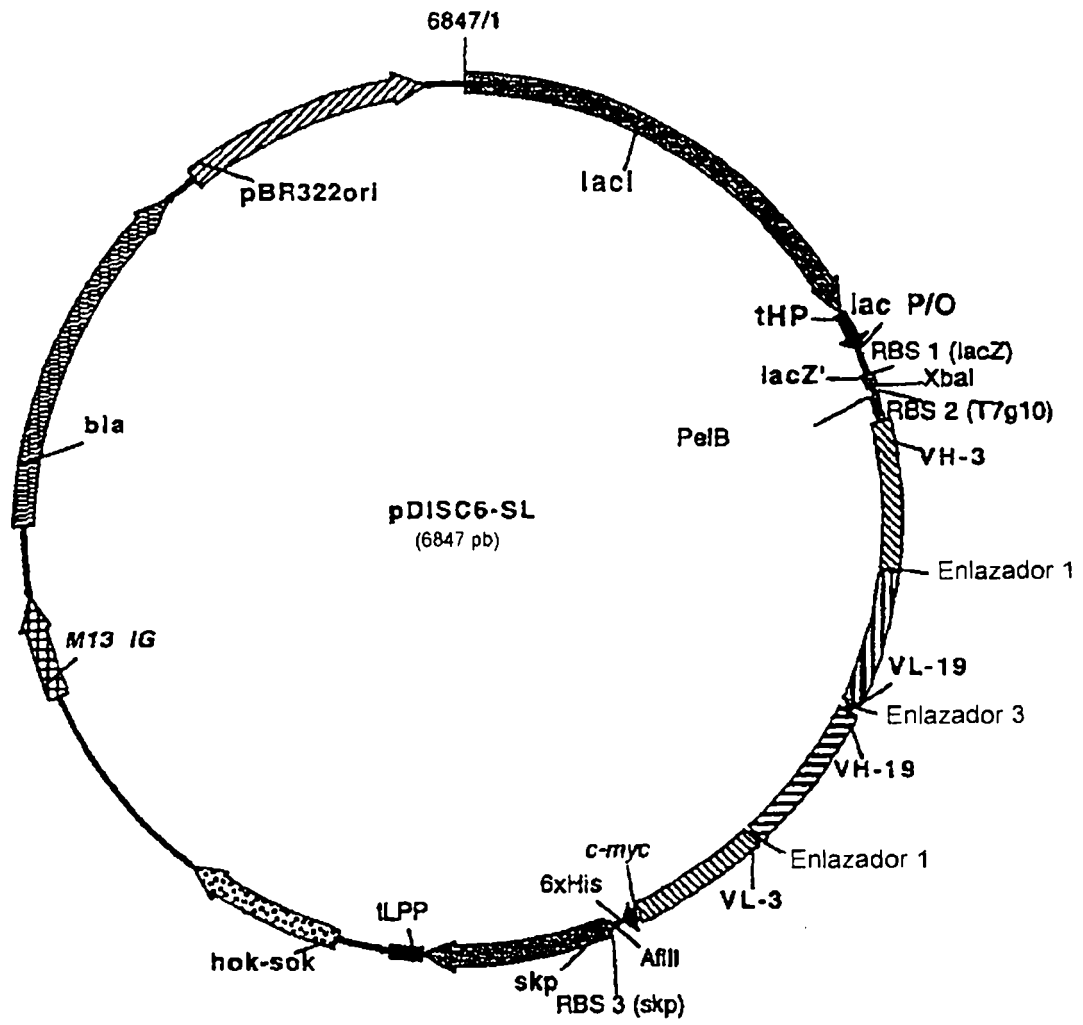


Fig. 6

ES 2 296 395 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INDICACIONES GENERALES:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: Deutsches Krebsforschungszentrum
 - (B) CALLE: Im Neuenheimer Feld 280
 - 10 (C) LOCALIDAD: Heidelberg
 - (E) PAÍS: Alemania
 - (F) CÓDIGO POSTAL: 69120
- 15 (ii) DENOMINACIÓN DE LA INVENCIÓN: Construcciones de anticuerpos multivalentes
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 17
- (iv) VERSIÓN LEGIBLE INFORMÁTICAMENTE:
- 20 (A) SOPORTE DE DATOS: disquete flexible
 - (B) ORDENADOR: compatible con PC IBM
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, versión #1.30 (OEP)

(2) INDICACIONES PARA SEC ID N°: 1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- 30 (A) LONGITUD: 1698 pares de bases
 - (B) TIPO: nucleótido
 - (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- 40 (iv) ANTISENTIDO: NO
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 - (B) POSICIÓN: 28..1689
- 45 (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: mat_peptide
 - (B) POSICIÓN: 28..1689
- 50 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 1:

GAATTCATTA AAGAGGAGAA ATTAACC ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACC GCA
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala
1 5

51

ES 2 296 395 T3

	GCC	GCT	GGG	DTG	CTG	CTG	CTG	ACA	GCT	CAG	CCG	GCT	ATG	GGG	CAG	CTG	99
	Ala	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Gln	Pro	Ala	Met	Ala	Gln	Val	
		10					15					20					
5	CAG	CTG	CAG	CAG	TCT	GGG	GCT	GAA	CTG	GCA	AGA	CCT	GGG	GCC	TCA	GTG	147
	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	
		25				30					35					40	
10	AAG	ATG	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGG	TAC	ACC	TTT	ACT	AGG	TAC	ACG	ATG	195
	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	
					45					50					55		
15	CAC	TGG	GTA	AAA	CAG	AGG	CCT	GGA	CAG	GGT	CTG	GAA	TGG	ATT	GGA	TAC	243
	His	Tyr	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Cys	
				60					65					70			
20	ATT	AAT	CCT	ACU	CGT	GCT	TAT	ACT	AAT	TAC	AAT	CAG	AAC	TTC	AAC	GAC	291
	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	
			75				80						85				
25	AAG	GCC	ACA	TTC	ACT	ACA	GAC	AAA	TCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	ATG	CAA	339
	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	
		90					95					100					
30	CTG	AGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TCT	CCA	GTC	TAT	TAC	TGT	GCA	AGA	387
	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	
		105				110					115					120	
35	TAT	TAT	GAT	GAT	CAT	TAC	AGC	CTT	GAC	TAC	TGG	GGC	CAA	GGC	ACC	ACT	435
	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Ser	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	
					125					130					135		
40	CTC	ACA	GTC	TCC	TCA	GCC	AAA	ACA	ACA	CCC	AAG	CTT	GGC	GGT	GAT	ATC	483
	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Lys	Leu	Gly	Gly	Asp	Ile	
				140					145					150			
45	CTG	CTC	ACC	CAA	ACT	CCA	GCT	TCT	TTG	GCT	GTG	TCT	CTA	GGG	CAG	AGG	531
	Leu	Leu	Thr	Gln	Thr	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	
			155				160						165				
50	GCC	ACC	ATC	TCC	TGC	AAG	GCC	AGC	CAA	AGT	GTT	GAT	TAT	GAT	GGT	GAT	579
	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Asp	Gly	Asp	
		170				175						180					
55	AGT	TAT	TTG	AAC	TGG	TAC	CAA	CAG	ATT	CCA	GGA	CAG	CCA	CCC	AAA	CTC	627
	Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Ile	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	
					185		190				195				200		
60	CTC	ATC	TAT	GAT	GCA	TCC	AAT	CTA	GTT	TCT	GGG	ATC	CCA	CCC	AGG	TTT	675
	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	Val	Ser	Gly	Ile	Pro	Pro	Arg	Phe	
				205				210							215		
65	AGT	GCC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACA	GAC	TCC	ACC	CTC	AAC	ATC	GAT	CCT	GTG	723
	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	
				220				225						230			

ES 2 296 395 T3

	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys
					85					90					95	
5	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp
				100					105						110	
	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Ser	Leu
			115					120					125			
10	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr
		130					135						140			
	Thr	Pro	Lys	Leu	Gly	Gly	Asp	Ile	Leu	Leu	Thr	Gln	Thr	Pro	Ala	Ser
	145					150					155					160
15	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser
					165					170					175	
	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Asp	Gly	Asp	Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln
20				180					185					190		
	Ile	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Leu
			195					200					205			
	Val	Ser	Gly	Ile	Pro	Pro	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp
25			210				215					220				
	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	Glu	Lys	Val	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr
	225					230					235					240
30	His	Cys	Gln	Gln	Ser	Thr	Glu	Asp	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr
					245					250					255	
	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly
				260					265						270	
35	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
			275					280						285		
	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ser
40							295					300				
	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Ser	Tyr
	305					310					315					320
45	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
					325					330					335	
	Gly	Gln	Ile	Trp	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe
				340					345					350		
50	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
			355					360						365		

55

60

65

ES 2 296 395 T3

Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 370 375 380

5 Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 385 390 395 400

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr
 405 410 415

10 Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met
 420 425 430

Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser
 435 440 445

15 Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro
 450 455 460

Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala
 465 470 475 480

20 His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
 485 490 495

Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser
 500 505 510

Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg
 515 520 525

30 Ala Asp Thr Ala Pro Thr Gly Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
 530 535 540

Asp Leu Asn Ser His His His His His His
 545 550

35

(2) INDICACIONES PARA SEC ID N°: 3:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 1653 pares de bases
 - (B) TIPO: nucleótido
 - (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
 - 45 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- 50 (iv) ANTISENTIDO: NO
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 - 55 (B) POSICIÓN: 28..1644
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: mat_peptide
 - 60 (B) POSICIÓN: 23..1644
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 3:

65

ES 2 296 395 T3

	GAATTCAGTA AAGAGGAGAA ACTAAAC AGG AAA TAC CTA TTG CDT ACG GCA Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala 1 5	51
5	GCC GCT GCC TTC CTG CCG CCG GCA GCT CAG CCG GCT ATG GCG CAG CTG Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val 10 15 20	69
10	CAA CTG CAG CAG TCT GCG GCT GAA CTG CCA AGA CCT GCG GCC TCA CTG Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Gln Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val 25 30 35 40	147
15	AAG ATG TCC TTC AAG GGT TCT GGC TAC ACC TTT ACT AGG TAC AGG ATG Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met 45 50 55	195
20	CAC TCG GTA AAA CAG AGG CDT GGA CAG CCT CTG GAA TGG ATT GGA TAC His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile Gly Tyr 50 55 70	243
25	ATT AAT CCT ACC CGT GGT TAT ACT AAT TAC AAT CAG AAG TTC AAG GAC Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp 75 80 85	291
30	AAG GCC ACA TTG ACT ACA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAA Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln 90 95 100	339
35	CTG AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TCT GCA AGA Leu Ser Ser Leu Thr Ser Gln Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg 105 110 115 120	387
40	TAT TAT GAT GAT CAT TAC AGC CTT GAC TAC TGG GCG CAA GCC ACC ACT Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr 125 130 135	435
45	CTC ACA GTC TCC TCA GCC AAA ACA ACA CCC AAG CTT GCC GGT CAT ATC Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile 140 145 150	483
50	TTG CTC ACC CAA ACT CCA GCT TCT TTG CCT CTC TCT CTA GCG CAG AGG Leu Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg 155 160 165	531
55	GGC ACC ATC TCC TGC AAG CCC ACC CAA ACT GTT GAT TAT GAT GGT GAT Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp 170 175 180	579

ES 2 296 395 T3

	AGT	TAT	TTG	AAC	IGG	TAC	CAA	CAG	ATT	CCA	GGA	CAG	CCA	CCC	AAA	CTC	627
	Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Ile	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	
	135					190					195				200		
5	CTC	ATC	TAT	GAT	GCA	TCC	AAT	CTA	GTT	TCT	GGG	ATC	CCA	CCC	AGG	TTT	675
	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	Val	Ser	Gly	Ile	Pro	Pro	Arg	Phe	
					205					210					215		
10	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACA	GAC	TTC	ACC	CTC	AAC	ATC	CAT	CCT	GTG	723
	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Cly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	
				220					225					230			
15	CAG	AAG	CTG	GAT	GCT	GCA	ACC	TAT	CAC	TCT	CAG	CAA	AGT	ACT	GAG	GAT	771
	Glu	Lys	Val	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	His	Cys	Gln	Gln	Ser	Thr	Glu	Asp	
			235					240					245				
20	CCG	TGG	ACG	TTC	GGT	GGA	GGC	ACC	AAG	CTG	GAA	ATC	AAA	CGG	GCT	GAT	819
	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Asp	
		250					255					260					
25	GCT	GGC	GCC	GCT	GGT	GGC	CCA	GGG	TGG	CAG	GTC	CAG	CTC	CAG	CAG	TCT	867
	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	
	265				270					275						280	
30	GGG	GCT	GAG	CTG	GTG	AGG	CCT	GGG	TCC	TCA	GTG	AAG	ATT	TCC	TGC	AAG	915
	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	
				285					290						295		
35	CCT	TCT	GGC	TAT	GCA	TTC	AGT	AGC	TAC	TGG	ATG	AAC	TGG	TTC	AAG	CAG	963
	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Ser	Tyr	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	
				300					305					310			
40	AGG	CCT	GGA	CAG	GCT	CTT	GAG	TGG	ATT	GGA	CAG	ATT	TGG	CCT	GGA	GAT	1011
	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Gln	Ile	Trp	Pro	Gly	Asp	
			315				320						325				
45	GGT	GAT	ACT	AAC	TAC	AAT	GGA	AAG	TTC	AAG	CCT	AAA	GCC	ACT	CTG	ACT	1059
	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	
		330					335					340					
50	GCA	GAC	GAA	TCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	ATG	CAA	CTC	AGC	AGC	CTA	GCA	1107
	Ala	Asp	Glu	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Ala	
	345					350					355					360	
55	TCT	GAG	GAC	TCT	GCG	GTC	TAT	TTC	TGT	GCA	AGA	CGG	GAG	ACT	ACG	ACG	1155
	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Arg	Glu	Thr	Thr	Thr	
				365					370					375			
60	ATA	GGC	CGT	TAT	TAC	TAT	GCT	ATG	CAC	TAC	TGG	GGT	CAA	GGA	ACC	TCA	1203
	Val	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	
				380					385					390			
65	GTC	ACC	GTG	TCC	TCA	GCC	AAA	ACA	ACA	CCC	AAG	CTT	GGC	GCT	GAT	ATC	1251
	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Lys	Leu	Gly	Gly	Asp	Ile	
			395				400						405				

ES 2 296 395 T3

	GTG CTC ACT CAG TCT CCA SCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG	1299
	Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys	
	410 415 420	
5	GTG ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG AAC TGG	1347
	Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp	
	425 430 435 440	
10	TAC CAG CAG AAG TCA GGC ACC TCC CCC AAA AGA TGG ATT TAT GAC ACA	1395
	Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr	
	445 450 455	
15	TCC AAA CTG GCT TCT GGA GTC CCT GGT CAC TTC AGG GGU AGT GGG TCT	1443
	Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser	
	460 465 470	
20	GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACC ATC AGC GGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT	1491
	Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala	
	475 480 485	
25	GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG ACT AGT AAC CCA TTC ACG TTC GGC	1539
	Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly	
	490 495 500	
30	TCG GGG ACA AAG TTG GAA ATA AAC CGG GCT GAT ACT GCA CCA ACT GGA	1587
	Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Ala Asp Thr Ala Pro Thr Gly	
	505 510 515 520	
35	TCC GAA CAA AAG CTG ATC TCA GAA GAA GAC CTA AAC TCA CAT CAC CAT	1635
	Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser His His His	
	525 530 535	
	CAU CAT CRC TAATCTAGA	1683
	His His His	

(2) INDICACIONES PARA SEC ID N°: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 539 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 4:

	Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala	
	1 5 10 15	
50	Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Ala Gln Gln Ser Gly Ala Glu	
	20 30	
55	Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly	
	35 40 45	

ES 2 296 395 T3

	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr	Thr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	
		50					55					60					
5	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Thr	
		65				70					75					80	
	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys	
					85					90					95		
10	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	
				100					105					110			
	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Ser	Leu	
			115					120					125				
15	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	
		130					135					140					
	Thr	Pro	Lys	Leu	Gly	Gly	Asp	Ile	Leu	Leu	Thr	Gln	Thr	Pro	Ala	Ser	
20		145				150					155					160	
	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	
					165					170					175		
	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Asp	Gly	Asp	Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	
25				180					185					190			
	Ile	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	
			195				200						205				
30	Val	Ser	Gly	Ile	Pro	Pro	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	
			210				215					220					
	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	Glu	Lys	Val	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	
						230					235					240	
35	His	Cys	Gln	Gln	Ser	Thr	Glu	Asp	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	
					245					250					255		
	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Gly	
				260				265						270			
40	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	
			275				280						285				
	Ser	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Ser	
45			290				295					300					
	Tyr	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	
					310						315					320	
50	Ile	Gly	Gln	Ile	Trp	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gly	Lys	
					325					330					335		

55

60

65

ES 2 296 395 T3

	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala
				340					345						350	
5	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Ala	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe
			355				360						365			
	Cys	Ala	Arg	Arg	Glu	Thr	Thr	Thr	Val	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Met
		370					375					380				
10	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr
	385					390					395				400	
	Thr	Pro	Lys	Leu	Gly	Gly	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile
				405						410					415	
15	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser
				420					425					430		
	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser
20			435					440					445			
	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
		450					455					460				
25	Ala	His	Phe	Arg	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile
	465					470					475				480	
	Ser	Gly	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp
				485						490				495		
30	Ser	Ser	Asn	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Asn
			500						505					510		
	Arg	Ala	Asp	Thr	Ala	Pro	Thr	Gly	Ser	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu
			515					520					525			
35	Glu	Asp	Leu	Asn	Ser	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His
	530					535										

(2) INDICACIONES PARA SEC ID N°: 5:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
 - (B) TIPO: nucleótido
 - 45 (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
- 50 (A) DESCRIPCIÓN: Meso = "cebador"
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- 55 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 5:

TATATACTGC AGCTGCACCT GCGACCCTGG GCCACCAGCG GCCGCAGCAT CAGCCCCG

57

60 (2) INDICACIONES PARA SEC ID N°: 6:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 45 pares de bases
 - 65 (B) TIPO: nucleótido
 - (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 296 395 T3

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"

5 (iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 6:

10 CCGTGAATTC CAGCTGCAAC TGCAGCAGTC TGGGGCTGAA CTGGC

45

(2) INDICACIONES PARA SEC ID N°: 7:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 34 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) FORMA DE CADENA: cadena simple

20 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"

25 (iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 7:

30 GGTCGACGTT AACCGACAAA CAACAGATAA AACG

34

(2) INDICACIONES PARA SEC ID N°: 8:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 348 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

40 (C) FORMA DE CADENA: cadena simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

45 (iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(ix) CARACTERÍSTICA:

50 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) POSICIÓN: 1..348

(ix) CARACTERÍSTICA:

55 (A) NOMBRE/CLAVE: mat_peptide

(B) POSICIÓN: 1..348

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 8:

60

65

ES 2 296 395 T3

	ATG	AGA	TPT	GCT	TCG	ATT	TTT	ACT	GCT	CTT	TTA	TTC	GCA	GCA	TCC	TCC	48
	Met	Arg	Phe	Pro	Ser	Ile	Phe	Thr	Ala	Val	Leu	Phe	Ala	Ala	Ser	Ser	
	1				5					10					15		
5	GCA	TTA	GCT	GCT	CCA	GTC	AAC	ACT	ACA	ACA	GAA	GAT	GAA	ACG	GCA	CAA	96
	Ala	Leu	Ala	Ala	Pro	Val	Asn	Thr	Thr	Thr	Glu	Asp	Glu	Thr	Ala	Gln	
				20					25				30				
10	ATT	CCG	GCT	GAA	GCT	GTC	ATC	GGT	TAC	TCA	GAT	TTA	GAA	GGG	GAT	TTC	144
	Ile	Pro	Ala	Glu	Ala	Val	Ile	Gly	Tyr	Ser	Asp	Leu	Glu	Gly	Asp	Phe	
			35					40					45				
15	GAT	GTT	GCT	GTT	TTG	CCA	TTT	TCC	PAC	AGC	ACA	AAT	AAC	GGG	TTA	TTG	192
	Asp	Val	Ala	Val	Leu	Pro	Phe	Ser	Asn	Ser	Thr	Asn	Asn	Gly	Leu	Leu	
			50				55				60						
20	TTT	ATA	AAT	ACT	ACT	ATT	GCC	AGC	ACT	GCT	GCT	AAA	GAA	GAA	GGC	CTA	240
	Phe	Ile	Asn	Thr	Thr	Ile	Ala	Ser	Ile	Ala	Ala	Lys	Glu	Glu	Gly	Val	
	65					70					75					80	
25	TCT	CTC	CAC	AAA	ACA	GAG	GCT	GAA	GCT	GAA	TTC	CAG	CTG	CAA	CTG	CAG	288
	Ser	Leu	Glu	Lys	Arg	Glu	Ala	Glu	Ala	Glu	Phe	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	
				85						90					95		
30	CAG	TCT	GGG	GCT	GAA	CTG	GCA	AGA	GCT	GGG	GCC	TCA	GTC	AAG	ATG	TCC	336
	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	
				100					105					110			
35	TGC	AAG	GCT	TCT													348
	Cys	Lys	Ala	Ser													
				115													

(2) INDICACIONES PARA SEC ID N°: 9:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 116 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

40 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 9:

	Met	Arg	Phe	Pro	Ser	Ile	Phe	Thr	Ala	Val	Leu	Phe	Ala	Ala	Ser	Ser	
	1				5					10					15		
50	Ala	Leu	Ala	Ala	Pro	Val	Asn	Thr	Thr	Thr	Glu	Asp	Glu	Thr	Ala	Gln	
				20					25				30				
55	Ile	Pro	Ala	Glu	Ala	Val	Ile	Gly	Tyr	Ser	Asp	Leu	Glu	Gly	Asp	Phe	
			35					40					45				
60	Asp	Val	Ala	Val	Leu	Pro	Phe	Ser	Asn	Ser	Thr	Asn	Asn	Gly	Leu	Leu	
			50				55					60					
65	Phe	Ile	Asn	Thr	Thr	Ile	Ala	Ser	Ile	Ala	Ala	Lys	Glu	Glu	Gly	Val	
	65					70					75					80	
70	Ser	Leu	Glu	Lys	Arg	Glu	Ala	Glu	Ala	Glu	Phe	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	
				85						90					95		
75	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	
				100					105					110			
80	Cys	Lys	Ala	Ser													
				115													

ES 2 296 395 T3

(2) INDICACIONES PARA SEC ID Nº: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 354 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) POSICIÓN: 1..354

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: mat_peptide
- (B) POSICIÓN: 1..354

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº: 10:

30	ATG AGA TTT CCT TGA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA TCC TCC Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser 1 5 10 15	48
35	GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA CAA Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln 20 25 30	96
40	ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe 35 40 45	144
45	GAT GTT GCT GGT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu 50 55 60	192
50	TTT ATA AAT ACT ACT ATT GGC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val 65 70 75 80	240
55	TCT CTC GAG AAA AGA GAG CCT GAA CCT GAA TTC ATG GCG CAG CTG CAA Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Glu Phe Met Ala Gln Val Gln 85 90 95	288
60	CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAA CTG GCA AGA CCT GGG GCC TCA GTG AAG Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys 100 105 110	336
65	ATG TCC TGC AAG GCT TCT Met Ser Cys Lys Ala Ser 115	354

(2) INDICACIONES PARA SEC ID Nº: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 118 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

ES 2 296 395 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 11:

```

5      Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
      1          5          10          15
      Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
      20          25          30
10     Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
      35          40          45
      Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
      50          55          60
15     Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
      65          70          75
      Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Glu Phe Met Ala Gln Val Gln
      85          90          95
20     Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys
      100         105         110
      Met Ser Cys Lys Ala Ser
      115

```

(2) INDICACIONES PARA SEC ID N°: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 42 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

- (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 12:

TCACACAGAA TTCTTAGATC TATTAAAGAG GAGAAATTA CC

42

(2) INDICACIONES PARA SEC ID N°: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 40 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

- (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador" .

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 13:

AGCACACGAT ATCACCGCCA AGCTTGGGTG TTGTTTTGGC

40

ES 2 296 395 T3

(2) INDICACIONES PARA SEC ID N°: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 43 pares de bases
(B) TIPO: nucleótido
(C) FORMA DE CADENA: cadena simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

- (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 14:

AGCACACAAG CTTGGCGGTG ATATCTTGCT CACCCAAACT CCA

43

(2) INDICACIONES PARA SEC ID N°: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 57 pares de bases
(B) TIPO: nucleótido
(C) FORMA DE CADENA: cadena simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

- (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 15:

AGCACACTCT AGAGACACAC AGATCTTTAG TGATGGTGAT GGTGATGTGA GTTTAGG

57

(2) INDICACIONES PARA SEC ID N°: 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 33 pares de bases
(B) TIPO: nucleótido
(C) FORMA DE CADENA: cadena simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

- (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 16:

CAGCCGGCCA TGGCGCAGGT GCAACTGCAG CAG

33

(2) INDICACIONES PARA SEC ID N°: 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

ES 2 296 395 T3

- (A) LONGITUD: 102 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) FORMA DE CADENA: cadena simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

- (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N°: 17:

TATATACTGC AGCTGCACCT GGCTACCACC ACCACCGGAG CCGCCACCAC CGCTACCACC 60

GCCGCCAGAA CCACCACCAC CAGCGGCCGC AGCATCAGCC CG 102